

国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)
[PCT18条、PCT規則43、44]

出願人又は代理人 の書類記号 YCT-513	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JPO0/05170	国際出願日 (日.月.年) 02.08.00	優先日 (日.月.年)
出願人(氏名又は名称) オリエンタル酵母工業株式会社		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(PCT18条)の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 3 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☒ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第III欄に示されているように、法施行規則第47条(PCT規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、
第 2 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)).
Int. Cl' C12Q1/68, C12N15/10, G10N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int. Cl' C12Q1/68, C12N15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
MEDLINE (STN),
WPI (IALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	JP, 7-59572, A (東ソー株式会社) 7. 3月. 1995 (07. 03. 95) &DE, 4333805, A1	1-6 1-14
X Y	JP, 7-238101, A (住友金属工業株式会社) 12. 9月. 1995 (12. 09. 95) ファミリーなし	1-6 1-14
Y	JP, 6-289016, A (住友金属工業株式会社) 18. 10月. 1994 (18. 10. 94) ファミリーなし	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

30. 10. 00

国際調査報告の発送日 07.11.00

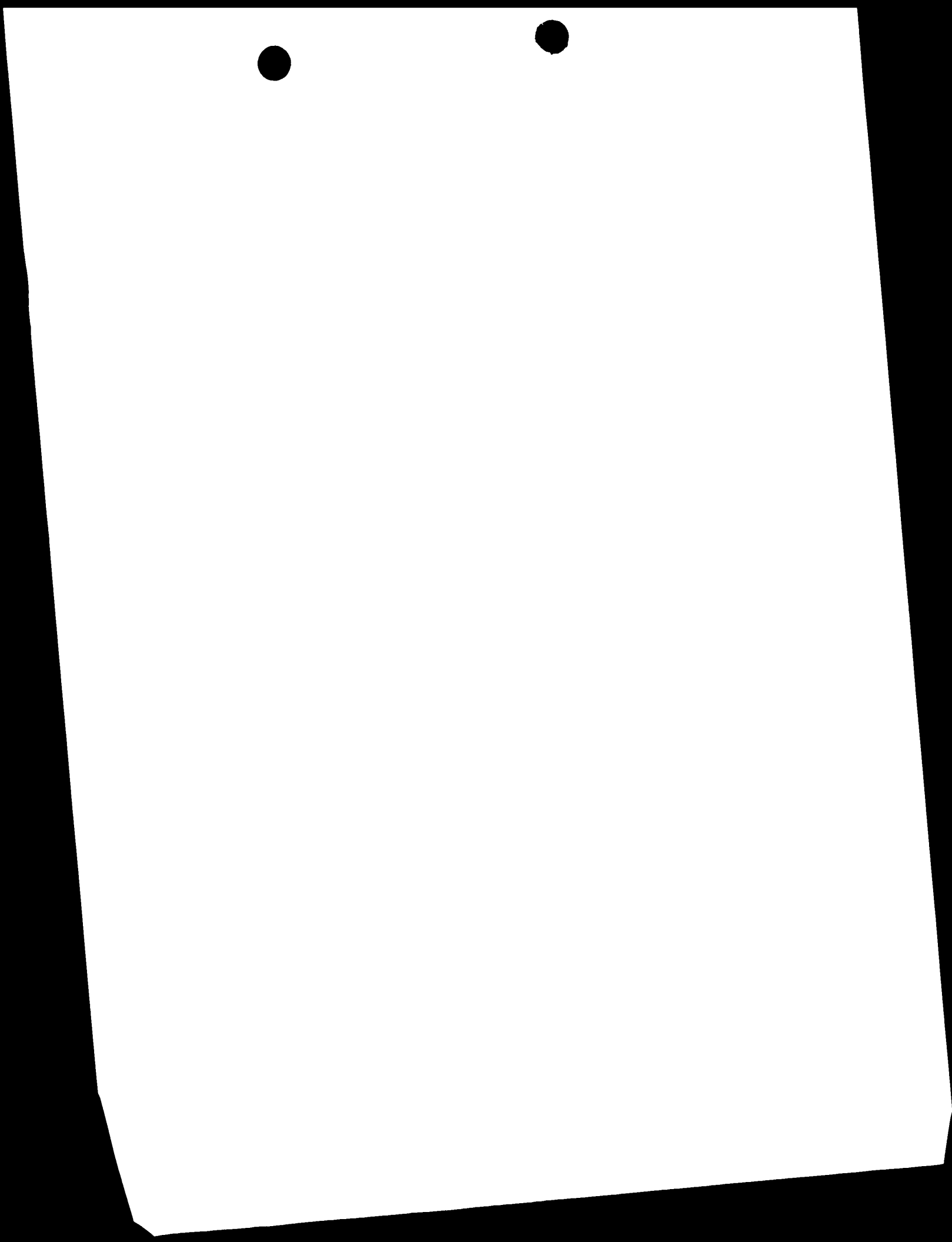
国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号 100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
甲斐 順子

4N 9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488



C (続き) .. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 07-236499, A (住友金属工業株式会社) 12. 9月. 1995 (12. 09. 95) ファミリーなし	1-14



VERIFICATION OF A TRANSLATION

I, the below named translator, hereby declare that:

My name and post office address are as stated below;

That I am knowledgeable in the English language and in the language in which the below identified application was filed, and that I believe the English translation of International Application No. PCT/JP00/05170 is a true and complete translation of the above-identified International Application as filed.

I hereby declare that all statements made herein of my own knowledge are true and that all statements made on information and belief are believed to be true; and further that these statements were made with the knowledge that willful false statements and the like so made are punishable by fine or imprisonment, or both, under Section 1001 of Title 18 of the United States Code and that such willful false statements may jeopardize the validity of the application or any patent issued thereon.

Dated this 2nd day of April, 2002

Full name of the translator: Reiko IZUMIYA

Signature of the translator:



Post Office Address: c/o YUASA AND HARA, Section 206,
New Ohtemachi Bldg., 2-1,
Ohtemachi 2-chome, Chiyoda-ku,
Tokyo, JAPAN



(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2002年2月14日 (14.02.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/12559 A1

(51) 国際特許分類: C12Q 1/68, C12N 15/10, G01N 33/50

(21) 国際出願番号:

PCT/JP00/05170

(22) 国際出願日:

2000年8月2日 (02.08.2000)

(25) 国際出願の言語:

日本語

(26) 国際公開の言語:

日本語

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): オリエンタル酵母工業株式会社 (ORIENTAL YEAST CO., LTD.) [JP/JP]; 〒174-8505 東京都板橋区小豆沢3丁目6番10号 Tokyo (JP). 国立感染症研究所長が代表する日本国 (JAPAN as represented by DIRECTOR GENERAL OF AGENCY OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒162-8640 東京都新宿区戸山1丁目23番1号 Tokyo (JP).

(YOSHIHARA, Namiko) [JP/JP]; 〒176-0021 東京都練馬区貫井2-14-25 Tokyo (JP). 鈴木寿子 (SUZUKI, Hisako) [JP/JP]; 〒330-0038 埼玉県大宮市宮原町2-9-4 Saitama (JP). 中村太一 (NAKAMURA, Taichi) [JP/JP]; 〒362-0806 埼玉県北足立郡伊奈町小室6309-3 Saitama (JP). 真鍋幸子 (MANABE, Sachiko) [JP/JP]; 〒110-0014 東京都台東区北上野2-1-12-803 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 社本一夫, 外 (SHAMOTO, Ichio et al.); 〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号 新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (DE, FR, GB, IT).

添付公開書類:

— 国際調査報告書

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 吉原なみ子

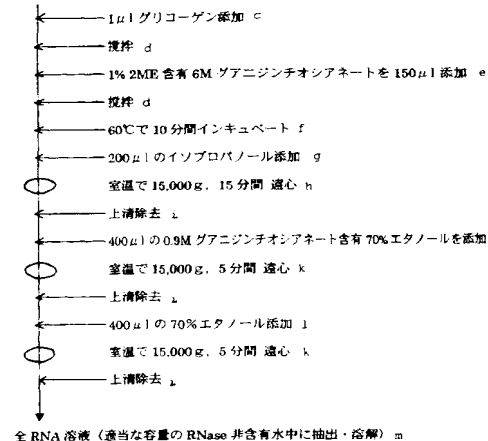
2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: KITS FOR EXTRACTING NUCLEIC ACID AND METHOD OF EXTRACTING NUCLEIC ACID BY USING THE KITS

(54) 発明の名称: 核酸抽出用キットおよび当該キットを用いる核酸の抽出方法

a G.G.法の手法の流れ図

b 血清又は血漿試料 (各0.5mlチューブ中50μl)



a ...FLOW CHART SHOWING THE PROCEDURE OF GG METHOD
b ...SERUM OR PLASMA SAMPLE (50 μl IN EACH 0.5 ml TUBE)
c ...ADDITION OF 1 μl OF GLYCOGEN
d ...STIRRING
e ...ADDITION OF 150 μl OF 6 M GUANIDINE THIOCYANATE CONTAINING 1% 2ME
f ...INCUBATION AT 60°C FOR 10 MIN
g ...ADDITION OF 200 μl OF ISOPROPANOL
h ...CENTRIFUGATION AT ROOM TEMPERATURE AT 15,000 g FOR 15 MIN
i ...REMOVAL OF SUPERNATANT
j ...ADDITION OF 400 μl OF 0.9 M GUANIDINE THIOCYANATE CONTAINING 70% ETHANOL
k ...CENTRIFUGATION AT ROOM TEMPERATURE AT 15,000 g FOR 5 MIN
l ...ADDITION OF 400 μl OF 70% ETHANOL
m ...TOTAL RNA SOLUTION (DISSOLVED/EXTRACTED IN APPROPRIATE VOLUME OF RNase-FREE WATER)

(57) Abstract: Kits for extracting a nucleic acid characterized by containing a reducing agent, a coprecipitater and a protein denaturing agent but being free from any proteases.

[続葉有]

WO 02/12559 A1



(57) 要約:

本発明は、還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を含み、タンパク質分解酵素を含まないことを特徴とする核酸抽出用キット、並びに当該キットを用いる核酸の抽出方法を提供する。

明細書

核酸抽出用キットおよび当該キットを用いる核酸の抽出方法

技術分野

本発明は、核酸抽出用キットおよび当該キットを用いる核酸の抽出方法に関する。

背景技術

血液、唾液等の生体試料における特定のDNA、RNA等の標的核酸の検出は、研究分野のみでなく、臨床分野においても極めて重要である。

例えば、近年、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）感染またはAIDS患者の数が急速に増加しており、日本のみでなく世界的な問題となっている。HIV感染の最近の疫学的傾向は、母子感染（vertical infection）またはより若年層の感染の比率が非常に増加していることである。臨床分野では、正確かつ迅速な遺伝的診断の開発が強く希求されている。日本では、特に血友病患者において、HIV感染若しくはAIDSの患者の主な感染経路は血液製剤を含む血液の輸血によると考えられている。しかしながら、血液製剤からの感染経路の詳細はほとんど解明されていない（Lin Qi Zhang, Peter Simmonds, Christopher A. Ludlam and Andrew J. Leigh Brown (1991), AIDS, p. 675-681）。また、AIDS治療を受けている患者において、HIVの量が減少する経過のチェックすることも重要である。

現在、HIVの抗原および抗体反応を用いた間接的な検出方法が確立されており、研究室での診断における主要な手法となっている。しかしながら、抗原-抗体反応による検出は、特にスクリーニングにおいて、ウィンドウピリオドに関する問題が知られていた。これは、抗原の感染から抗原または抗体の産生までの時間のずれ（time-lag）である。HIV感染の早期の臨床診断のためには、抗原および抗体反応を用いた非直接的な方法のかわりに、血液中のHIV RNAの存在を正確、直接的かつ迅速に検出することが重要である。より微量の

試料およびより高感度での検出、さらに、費用節減およびウィンドウピリオドの短縮化を可能とする新たな検出方法の開発が強く望まれている。特に、子供の感染または母子感染において、極微量の試料でHIV感染を診断できることが必要である。

- 5 例えば、複製連鎖反応（PCR）もしくはスクリーニング等の分子生物学的技術の臨床応用への新たな導入（Gerald Schochetman and John J. Sninsky（1991），"Direct Detection of Human Immunodeficiency Virus Infection Using the Polymerase Chain Reaction" Springer-Verlag p. 90-110；
10 Janet S. Bootman, Pete A. Kitchen（1994），J. Virological Methods, p. 1-8；Anne-Mieke Vandamme, Sonia Van Dooren, Wessel Kok, Patrick Goubau, Katrien Franssen, Tim Kievits, Jean-Claude Schmit, Erik De Clercq, Jan Desmyter（1995），J. Virological Methods p. 121-132；E. Lyamuya, U. Bredberg-Raden, J. Albert, O. Grankvist, V. Msangi,
15 C. Kagoma, F. Mhalu, and G. Biberfeld（1997），J. Clinical Microbiology, p. 278-280）により、HIV自体の直接的かつ迅速な検証が可能となる。このような、核酸の抽出をPCR等の核酸増幅反応と組み合わせた核酸の検出系は、核酸抽出、増幅および検出の3つの別個の工程からなる。核酸抽出は、続く増幅および検出のための重要な工程であり、核酸抽出方法の改良により、
20 増幅および検出の効率が上昇する。

現在、数種類の全RNA抽出方法が知られており、複数の市販のキットが利用可能である（John M. Chirgwin, Alan E. Przybyla, Raymond J. MacDonald and Willi

am J. Rutter (1979), Biochemistry p. 5294-5299; Osamu Yamada, Toshiya Matsumoto, Masahiro Nakashima, Shinobu Hagari, Toshio Kamahora, Hiroshi Ueyama, Yuichiro Kishi, Hidetoshi Uemura and Takashi Kurimura (1990), J. Virological Methods p. 203-210)。

しかしながら、これらの方法は、除タンパクのためにフェノール、クロロホルム等の有機溶媒を用いる、抽出工程中にチューブを何度も取り替える必要がある等の問題があった。また、極微量の試料、特に血液製剤や子供の血液試料からの抽出には理想的ではない。さらに、スクリーニング等の多数の試料を取り扱うには費用がやや高くなるという問題もある。そこで、迅速かつ安価なHIV RNA検出系の開発の重要性がますます高まっている。

近年、核酸、特にRNAの抽出方法において、グアニジンシアネート-フェノール-クロロホルム (AGPC) 法 (Piotr Chomczynski, Nicolette Sacchi (1987), Analytical Biochemistry p. 156-159)、およびCsCl₂または樹脂を用いるような数種類の方法が知られるようになった (Maniatis T. et al.: Molecular Cloning: A laboratory manual, 2nd ed., Cold Spring Harbor 1989)。さらに、本明細書中に参考文献として援用する特開平7-236499は、APGC法の改良法として、有機溶媒を用いず、また抽出工程を1本のチューブで行えるウイルス核酸の抽出方法を開示している。

25 発明の概要

本発明は、還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を含み、タンパク質分解酵素を含まないことを特徴とする、核酸抽出用キットを提供することを目的とする。

本発明の核酸抽出用キットは、好ましくはRNA抽出用のキットである。

本発明は、また、生体試料から核酸を抽出する方法を提供することを目的とする。本発明の核酸抽出方法は、

- i) 生体試料に還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を加えてインキュベートして、タンパク質分解酵素を用いることなく生体試料中のタンパク質およびその他の混在物を分解、変性し、そして

i i) そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行うことを含む、ことを特徴とする。

図面の簡単な説明

- 図 1 は、核酸抽出に用いるグリコーゲン濃度を変化させて核酸抽出、増幅を行った反応物の電気泳動図である。

図 2 は、本発明の核酸抽出方法の好ましい態様の流れ図ある。

図 3 は、本発明の方法により抽出された核酸の配列を示す。

発明の詳細な説明

核酸検出のための手法は、3つの主工程、即ち、核酸抽出、増幅および検出からなる。核酸抽出工程の改善は、続く増幅および検出工程のためにも重要である。

- 本発明時において、多くの核酸検出方法で用いられている抽出方法は前述した A G P C 法であった。本発明者らは、改変 A G P C 法および共沈剤との組み合わせによって、試料からの新規な核酸抽出方法を見出し、本発明を想到した。以下詳述する。

核酸抽出用キット

- 具体的には、本発明は、還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を含み、タンパク質分解酵素を含まないことを特徴とする、核酸抽出用キットを提供する。

本発明は、タンパク質分解酵素を用いないことを重要な特徴とする。従来法では、生体試料からタンパク質を除去するために、先ずプロテナーゼK、プロナーゼ、スブチリシン等の非特異的なタンパク質分解酵素を用いていた。本発明で

は、このようなタンパク質分解酵素を用いることなく、共沈剤およびタンパク質変性剤のみで核酸を効率よく抽出することを可能にしたものである。

i) 還元剤

本発明において還元剤は、限定されるわけではないが、2-メルカプトエタノール、ジチオスレイトール等である。これらの還元剤はタンパク質中のスルフヒドリル基の保護や、ジスルフィド結合の還元的切断に用いられる。

還元剤の濃度は特に限定されず、好ましくは約1%の濃度で用いることができる。還元剤は、予めタンパク質変性剤に含有させた状態で核酸に添加してもよい。

10 ii) 共沈剤

本発明において共沈剤は、特に限定されず核酸を共沈させる担体として機能するものであれば使用可能である。共沈剤の例としては、高分子多糖類が好ましく、グリコーゲン、デキストラン等がある。

グリコーゲンはD-グルコースの重合体で分子量は100万-数百万程度であり、核酸沈殿のための最も強力な担体の一つであることが知られている (Steven Tracy (1981), Biochemistry p. 251-268) おり、市販されている数種のグリコーゲンが *in vitro* での使用のために利用可能である。本発明において、費用および検出感度の観点よりアオガイ (slipper limpet) 由来のグリコーゲンが好ましい。

20 共沈剤の使用濃度は、特に限定されないが、例えばアオガイ (カサ貝) のグリコーゲンで、0.1 mg/ml ないし 2.0 mg/ml、好ましくは 0.2 mg/ml ないし 2.0 mg/ml、最も好ましくは約 0.2 mg/ml である (実施例 2)。

iii) タンパク質変性剤

25 タンパク質変性剤としては、タンパク質を可溶化することが可能な公知のものを使用できる。特に限定されないが、グアニジンチオシアネート、尿素等があり、特にグアニジンチオシアネートが好ましい。本発明の好ましい態様として、共沈剤として特にグリコーゲンを、そしてタンパク質変性剤としてグアニジンチ

オシアネートを用いた場合を、グリコーゲン-グアニジニウム法（GG法）という。

タンパク質変性剤は、最終濃度で3 Mないし7 M、好ましくは4 Mないし6 M、最も好ましくは約4.5 Mの濃度で用いることができる。好ましくは飽和濃度のタンパク質変性剤により、タンパク質を溶解できる。また、特にRNAの抽出の場合、生体試料に混在する可能性のあるRNaseを効率よく抑制することが可能である。

タンパク質変性剤は、好ましくは生体試料と共沈剤を混合した後に、反応物に添加される。前述したように、予め還元剤を含ませた状態で反応液に添加してもよい。

さらに、限定されるわけではないが、抽出工程の最終段階のアルコール沈殿において、アルコールにタンパク質変性剤を加えておくことにより、特に、血液製剤のように多くの混在物を含む試料の場合、混在するタンパク質をより明白に除去することができる。アルコール沈殿の段階でアルコールに添加するタンパク質変性剤は好ましくは0.5 Mないし2.0 M、最も好ましくは約0.9 Mである（実施例3）。

本発明においては、核酸の抽出工程において特に外部から塩を添加する必要はなく、核酸抽出用キットは特に塩を必要とはしない。また、特にpHを外部より調製する必要はない。

20 核酸の抽出方法

本発明はさらに、生体試料から核酸を抽出する方法を提供する。

本発明の方法は、

i) 生体試料に還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を加えてインキュベートして、タンパク質分解酵素を用いることなく生体試料中のタンパク質およびその他の混在物を分解、変性し、そして

ii) そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行うことを含む、ことを特徴とする。

本発明においては、一般には生体試料が約50 μ l程度あれば核酸抽出を行うことが可能である。好ましくは、生体試料の容量は30 μ lないし100 μ lで

ある。これは従来の方法で必要とされる生体試料の容量よりも有意に少なく済むことを意味する。

限定されるわけではないが、工程 i) において、まず生体試料に共沈剤を加えて混合した後に、さらに、還元剤およびタンパク質変性剤を加えるのが好ましい。

工程 i) において、インキュベーションは 55℃ - 65℃ で、好ましくは、約 60℃ で、5 分 - 15 分、好ましくは約 10 分行う。最も好ましくは、インキュベートを約 60℃ で約 10 分間行う。インキュベーションは、限定されるわけではないが、例えば、恒温槽、PCR 装置（例えば、パーキンエルマー社のサーマルサイクラー（商標））等の装置を用いて行うことができる。

次いで、工程 ii) では、工程 i) で得られた反応物に低級アルコールを添加して核酸を析出沈殿させる。アルコール沈殿は、公知の方法で行うことができる。低級アルコールとしては、イソプロパノール、エタノール等を用いることが可能である。好ましくは、イソプロパノール最終濃度 40% 以上、エタノール最終濃度 70% 以上になるように添加する。この際、低級アルコール添加後にマイナス 70℃ ないし 4℃ にて冷却し、塩析効果を高めることもできる。

また、前述のようにアルコール沈殿の際にタンパク質変性剤を加えてもよい。これにより、核酸とともに沈殿してくる混在物を除去することが可能である。

アルコール沈殿に次いで、14,000 × g ないし 19,000 × g で、5 分ないし 15 分遠心を行う。遠心は室温で行ってよく、また、約 4℃ の冷却遠心を行ってもよい。沈殿した核酸は、遠心後、上清をデカンテーションまたは吸引により取り除き回収する。

最後に得られた核酸を、例えば 70% エタノールで洗浄し、適当な溶液に再溶解して使用可能な状態とすることができる。

上述の抽出工程は全段階を 1 つのチューブ内で行うことが可能である。これにより、抽出工程においてチューブを交換することによる汚染を防ぐことができる。このことは、特に、後に PCR 等によって核酸の増幅を行う場合に特に重要である。さらに、従来の方法が少なくとも 1.5 ml 以上の大きさのチューブを必要としていたのに対し、本発明の抽出工程は 0.5 ml チューブ内で行うこと

が可能である。これにより、必要な各試薬の量は節減され、また0.5mlにて再溶解した核酸をそのまま、増幅反応に用いることができる。

限定されるわけではないが、本発明の好ましい態様の一つは実施例1および図2に記載したものである。

- 5 上述した本発明の核酸抽出方法は、DNAおよびRNAのいずれの抽出にも適用可能である。好ましくはRNA抽出に用いることができる。臨床分野の適用として、実施例に記載したAIDSウイルスのHIVのRNAの他に、C型肝炎ウイルス(HCV)、インフルエンザウイルス、A型肝炎ウイルス等への適用が可能である。生体試料は、特に血清、血漿等の血液試料に加え、脳脊髄液、唾液、
10 精液、尿等の可溶性液体試料に有用である。さらに、血漿または血清を由来とする粉末血液製剤等にも使用可能であり、応用範囲は広い。特に、子供由来の試料または粉末血液製剤等の微量の試料に対して有効である。

- 本発明の方法により抽出された核酸は、次いで、必要に応じて増幅を行い検出
15 することが可能である。即ち、本発明の方法をPCR等の増幅方法と組み合わせることにより、従来の方法では検出できなかった極微量の低濃度の核酸でも検出が可能となった。

増幅

(1) 逆転写反応

- 標的核酸がRNAウイルス等のRNAの場合、抽出に用いたチューブのまま
20 で、RNAをcDNAに転換する逆転写酵素により逆転写反応を行うことが可能である。即ち、本発明の方法により抽出されたRNAは逆転写反応を阻害するような物質を含んでいない高純度なものである。逆転写酵素としては、例えば、後述する実施例1で使用したトリ骨髄赤芽球症ウイルス由来の逆転写酵素(AMVRT)を用いることができる。

25 (2) 核酸の増幅

本発明の方法により抽出された核酸は、DNAであればそのまま、RNAであればcDNAに逆転写の後、例えば、核酸に特異的なプライマーを用いた複製連鎖反応(PCR)等の公知の核酸増幅反応により増幅することができる。通常の

P C R 法は厳密な条件を必要とするが、本発明の方法により抽出された核酸は、増幅反応を阻害するような不純物を含まない高純度なものである。

核酸の増幅反応は、例えば後述の実施例 1 のように、標的核酸の外側のプライマー対で先ず第 1 P C R を行い、次いで、内側のプライマー対で第 2 P C R を行う入れ子型 P C R (n e s t e d P C R) を行ってもよい。また、標的核酸へのプライマーの親和性の相違により、増幅の程度は異なってくる可能性がある。例えば、後述する実施例の H I V - 1 において、 g a g プライマーと p o l プライマーを用いた場合では増幅に若干差が生じ、 p o l プライマーを用いた方が g a g プライマーの場合よりも、検出感度が高かった。

10 検出

増幅された核酸は、電気泳動、配列決定等の常法により検出、確認することができる。例えば、電気泳動は、ポリアクリルアミドまたはアガロースゲルを用いて電気泳動後、エチジウムブロマイド染色により検出することができる。配列も市販の核酸配列決定装置を用いて既知の方法によって確認することができる。

15 上述したように、本発明の方法は核酸抽出の高い費用効率、高感度、安全性および時間短縮を達成する。P C R 等の増幅方法との組み合わせにより、例えばウイルス感染の正確で直接的かつ迅速な診断を可能とする。本発明の G G 法は研究分野のみでなく臨床分野においても応用可能である。

20 以下、実施例によって本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の技術的範囲を限定するためのものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾、変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

25 実施例

本発明の実施例においては、特に明示しない限り下記の材料を用いた。

材料

(1) 試料

AOMPLICOR HIV-1 MONITOR Testキット（商標）
（ロシュ社）およびNASBA増幅システム（Organon Teknika
社、オランダ国、ボクステル）の双方で、HIV-1 RNAを30,000コ
ピー／ml以上含む高コピー含有試料を26サンプル、並びに上記いずれの方法
5 でも検出限界以下の低コピー含有試料（1,000コピー／ml以下）を47サ
ンプル用いた。

（2）グリコーゲン

カキのグリコーゲン（SIGMA社）、アオガイのグリコーゲン（SIGMA
社）、ウサギのグリコーゲン（SIGMA社）またはウシのグリコーゲン（SI
10 GMA社）を用いた。

（3）対照として用いたRNA抽出方法

実施例では本発明の対照として下記の7種類の市販のキットおよび方法を用い
た。

TRIZOL LS（商標）
15 ISOGEN LS（商標）（ニッポンジーン社）
RNA抽出方法（STRATAGENE社）
SepaGene-RV（商標）（三光純薬）
NASBAのRNA抽出キット（Organon Teknika社）
Smitest（商標）（住友金属）
20 Catrimox（Iowa Biotechnology社）

実施例1 GG法によるRNAの抽出ならびに抽出されたRNAの増幅および検
出

下記の方法により、HIV-1含有試料より、HIV-1 RNAの抽出、増幅
25 および検出を行った。

a. RNA抽出

本発明のGG法の一例として図2に示したスキームに従って、試料よりRNA
を抽出した。

0.5 ml チューブにおいて、50 μ l の試料に1 μ l のグリコーゲン (10 mg/ml) を添加し、攪拌した。1%の2-メルカプトエタノール (2 ME) を含む、150 μ l の6 M グアニジンチオシアネートを加えた。60°Cで10分間インキュベートした。200 μ l のイソプロパノールを添加した。室温下、
 5 15,000 g で15分間遠心を行い、次いで上清を除去した。0.9 M のグアニジンチオシアネートを含む400 μ l の70%エタノールを加えた。室温下、15,000 g で5分間遠心を行い、次いで上清を除去した。400 μ l の70%エタノールを加えた。室温下、15,000 g で5分間遠心を行い、次いで上清を除去した。残渣を10 μ l のRNase 不含滅菌水に溶解した。

10 b. 増幅

1) プライマー

HIV-1 RNA の増幅には、以下の表1に示す gag および/または pol プライマー (配列番号1-8) を用いた (Los Alamos 国立研究所から入手したAIDSのヒトレトロウイルスに由来)。

15

表1

プライマー	配列		位置	配列番号
GF 6 2	AAGGATAGAGGTAAAAGACACCA	gag	270-292	1
GF 6 3	TAGCTGCTGGTCCAATGCTTTTA	gag	1022-999	2
SK 1 0 0	ATCAAGCAGCCATGCAAAAT	gag	581-599	3
SK 1 0 4	CTTTTGCTCCTTGCTTATGTC	gag	871-859	4
UNIPOL 1B	AGTGGATATATAGAAGCAGAAGT	pol	2385-2407	5
UNIPOL 1A	CCCCCAATCCCCCTTTTCTTTTAAAA	pol	2722-2696	6
P 5	ATTAGCAGGAAGATGGCC	pol	2453-2470	7
P 6	TACTCCTTGACTTTGGGG	pol	2594-2577	8

GF 6 2 と GF 6 3 のプライマー対および UNIPOL 1B と UNIPOL 1A のプライマー対は、各々 gag および pol の外側 (outer) プライマ

一対となる。これに対し、SK100とSK104のプライマー対およびP5およびP6プライマー対は、各々gagおよびpolの内側(inner)プライマー対となる。

2) PCR

5 上記抽出RNAを用い、慣用されたRCR法により核酸の増幅を行った。

i) まず、10 μ lの滅菌水に溶解させた上記抽出RNAを含む0.5mlチューブにミネラルオイル2滴を添加し、軽く攪拌(フラッシュ)させた。次いで、PCRにおけるプライミングを妨害するようなRNA会合体や2次構造を破壊するために、サーマルサイクラー(商標)(パーキンエルマー社)を用いて8
10 0℃で10分間インキュベーションした。10分後、素早く氷中にうつして反応を終了させ、フラッシュした。

ii) 次いで、下記の表2の組成のRT用混合物15 μ lを加え、ボルテックス(攪拌)、そしてフラッシュを行った。

表2 RT用混合物の組成

H ₂ O	7.13
×10 PCR用バッファー	2.5
10mM MgCl ₂	2.0
10mM DTT	0.5
2.5mM dNTP	1.5
1 μ l/ml プライマー1(外側)	0.25
1 μ l/ml プライマー2(外側)	0.25
10U/ μ l RNase阻害剤	0.77
<u>2.5U/μl 逆転写酵素(AMVRT)</u>	<u>0.1</u>
合計	15.00 μ l

15 温浴中(42℃)で60分間インキュベーションを行うことにより、mRNAよりcDNAを合成した。その後フラッシュを行った。

i i i) 次いで、サーマルサイクラーを用いて99℃で6分間インキュベーションを行うことにより、mRNA-cDNAの2本鎖を1本鎖にした。6分後、素早く氷中にうつして反応を終了させ、フラッシュした。

5 i v) 次いで、下記の表3の組成の第1PCR用混合物75μlを加え、ボルテックス、そしてフラッシュを行った。

表3 第1PCR用混合物の組成

H ₂ O	58
×10 PCR用バッファー	7.5
10mM MgCl ₂	3.0
2.5mM dNTP	4.5
1μl/ml プライマー1 (外側)	0.75
1μl/ml プライマー2 (外側)	0.75
Taq ポリメラーゼ	0.5
合計	75.00μl

サーマルサイクラーを用いて第1PCRを行った。具体的には、下記のサイクルを30サイクル繰り返した。

94℃-30秒間、55℃-30秒間、72℃-1分間

次いで、72℃で10分間インキュベートし、次いで4℃で反応を終了させた。

10 v) 次いで、新たな0.5mlチューブに、vi) で得られた第1PCR産物10μlおよびミネラルオイルを加えてフラッシュした。次いで、サーマルサイクラーを用いて99℃で6分間インキュベーションを行うことにより、2本鎖DNAを1本鎖にした。6分後、素早く氷中にうつして反応を終了させ、フラッシュした。

15 vi) 次いで、下記の表4の組成の第2PCR用混合物90μlを加え、ボルテックス、そしてフラッシュを行った。

表4 第2PCR用混合物の組成

H ₂ O	66.5
×10 PCR用バッファー	10
10mM MgCl ₂	5
2.5mM dNTP	6
1μl/ml プライマー3 (内側)	1
1μl/ml プライマー4 (内側)	1
Taq ポリメラーゼ	0.5
合計	90.0μl

サーマルサイクラーを用いて第2PCRを行った。具体的には、下記のサイクルを30または40サイクル繰り返した。

94℃-30秒間、55℃-30秒間、72℃-1分間

次いで、72℃で10分間インキュベートし、次いで4℃で反応を終了させた。

5 c. 検出

電気泳動および染色

増幅に次いで、PCR産物を電気泳動した。具体的には、第2PCR産物に色素 (dye) を加え、そのうち10μlを5%アクリルアミドゲルまたは2%ア
 10 ガロースゲルに装填して泳動した。分子量マーカーとして、ΦX174のHae
 III消化物 (ロシュ社) を用いた。陽性対照としてHIV-1感染細胞系であるMOLT-4/HTLV-IIIの培養上清を用いた。泳動終了後、臭化エチジウムを用いて染色して可視化した。

実施例2 RNA抽出に用いるグリコーゲンの最適濃度

担体として用いるグリコーゲンの濃度を変化させ、抽出の効率、時間の短縮お
 15 よび費用効率の観点から最適濃度を調べた。

具体的には、試料として先に定義したHIV-1の低コピー含有試料を用い、前述した本発明のGG法によりRNAを抽出した。ただし、グリコーゲンは0、5、10、50または100mg/mlの濃度のものを各々1μl用い、最終濃

度が各々 0、0.1、0.2、1 または 2 mg/ml となるように変化させた。抽出された RNA を PCR で 30 サイクルまたは 40 サイクル増幅させた。増幅用プライマーは、gag 用プライマー対として sk100 および sk104、pol 用プライマー対として p5 および p6 をそれぞれ用いた。理論上、gag 用プライマー対の場合 291 塩基対、pol 用プライマー対の場合 142 塩基対の PCR 産物が得られることとなる。

得られた第 2 PCR 産物の 9 μ l に色素 1 μ l を加え、これを 5% ポリアクリルアミドまたは 2.0% アガロースゲルに装填して電気泳動を行った。臭化エチジウムで染色してバンドを検出した。

10 結果を図 1 に示す。図 1 のパネル A、B および C は各々、gag プライマー対で 30 サイクル、gag プライマー対で 40 サイクル、そして pol プライマー対で 30 サイクルである。各パネルのレーン 1 ないし 5 は各々グリコーゲンの濃度が、0 mg/ml、0.1 mg/ml、0.2 mg/ml、1 mg/ml および 2 mg/ml である。レーン 6 は陽性対照 (P)、レーン 7 は陰性対照 (N) である。分子量マーカー (ロシュ社) である。

図 1 に示されるように、いずれの場合もグリコーゲン濃度が 0.2 mg/ml ないし 2 mg/ml (レーン 3 ないしレーン 5) ではバンドが検出された。よって、グリコーゲン濃度が 0.2 mg/ml 程度以上存在すれば、担体として機能しうる。

20 実施例 3 RNA 抽出に用いるグアニジンチオシアネートの最適濃度

最後のエタノール洗浄工程で 70% エタノールに添加するグアニジンチオシアネートの濃度を変化させ、抽出の効率の観点から最適濃度を調べた。

具体的には、試料として先に定義した HIV-1 の低コピー含有試料を用い、前述した本発明の GG 法により RNA を抽出した。ただし、最後のエタノール洗浄工程で 70% エタノールに添加するグアニジンチオシアネートを 0.0 M、0.6 M、0.7 M、0.8 M、0.9 M および 1.0 M に変化させた。

この結果、グアニジンチオシアネート濃度が 0.8 M 以下であると、最終 RNA に混在物が塊としてやや残るが、0.9 M 以上であると塊が消滅した。

実施例 4 RNA抽出効率の比較

本発明のGG方法の効率を、HIV試料を用いて既知の市販のRNAまたはDNA抽出キットと比較した。

- 具体的には、対照として広く使用されている市販の7種類のRNAまたはDNA抽出キットを採用し、各キットの通常的使用方法に従って核酸抽出を行った。試料は、前述した高コピー含有試料および低コピー含有試料の各々26及び47サンプルを用いた。核酸の増幅は、前述したgagプライマー対および／またはpolプライマーを用いてPCRを行い、前述したように検出を行った。

結果を以下の表5に示す。

表 5

抽出方法	GG法	A	B	C	D
高コピー	2 6 / 2 6	1 0 / 2 6	1 2 / 2 6	1 2 / 2 6	1 0 / 2 6
	2 6 / 2 6	1 0 / 2 6	1 2 / 2 6	1 2 / 2 6	1 0 / 2 6
	2 6 / 2 6	1 1 / 2 6	1 1 / 2 6	1 2 / 2 6	9 / 2 6
	(1 0 0)	(3 9 . 7)	(4 4 . 9)	(4 6 . 2)	(3 7 . 2)
低コピー	3 8 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7
	3 8 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7
	3 7 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7	0 / 4 7
	(8 0 . 2)	(0)	(0)	(0)	(0)
抽出方法	E	F	G		
高コピー	1 0 / 2 6	2 6 / 2 6	2 6 / 2 6		
	1 0 / 2 6	2 6 / 2 6	2 6 / 2 6		
	1 0 / 2 6	2 6 / 2 6	2 6 / 2 6		
	(3 8 . 5)	(1 0 0)	(1 0 0)		
低コピー	0 / 4 7	3 3 / 4 7	3 6 / 4 7		
	0 / 4 7	3 3 / 4 7	3 6 / 4 7		
	0 / 4 7	3 2 / 4 7	3 5 / 4 7		
	(0)	(6 9 . 5)	(7 5 . 9)		

高コピー含有試料では、対照のAないしEキットで約35%ないし50%前後、そしてFまたはGキットでは100%検出された。これに対し、本発明の方法では、100%検出できた。さらに、低コピー含有試料では、対照のAないしEキットでは全く検出されず、FまたはGキットでも約70%前後の検出であつ

た。これに対し、本発明の方法では、低コピー含有試料でも80.2%検出可能であった。

本発明は、既存の多数のRNA抽出方法と比較して有意に優れた抽出効率を示すことが明らかとなった。

5 実施例5 増幅核酸の配列の確認

増幅された試料について、配列決定を行った。

具体的には、自動配列決定機ABI-PRISM310（商標）（Perkin-Elmer社）を用い、製造者に推奨される直接配列決定法に従った。本実施例の標的領域は、HIV-1のgagまたはpol領域である。比較配列は、
10 Los Alamos 国立研究所の年次報告書に従った。データ分析は進化系統樹によって行った。

gagプライマー対を用いたPCR産物についての結果を図3および配列番号10-19に示す。本発明のGG法によりRNA抽出を行ったサンプルはすべて、核酸の塩基配列の決定が可能であった。10サンプルについて配列決定を行い、共通配列としてサブタイプEが明らかとなった（図3）。配列データは、
15 調べた10サンプルは全てHIV-1のgag領域（291塩基）の共通配列（配列番号9）と90%以上相同性を有することを示す。図3において共通配列と同じ塩基は「-」で示した。

これより、核酸抽出された各試料はHIV-1 RNAを含有すること、そして、
20 当該RNAの抽出および増幅によりHIV-1の存在が検出されたことが確認された。

効果

本発明者らは、市販のキットを用いた既知の抽出方法を本発明の方法と比較した。その結果、検出感度、経済性および時間短縮の観点から本発明の方法が最も
25 優れた抽出法であった。

従来のCsCl₂または樹脂を用いる方法は、時間短縮の面では適当であるが、検出感度は本発明の方法ほどよくなかった。また、本発明の方法はフェノールもクロロホルムも使用しないためAGPC法よりも安全である。さらに、フェノールおよびクロロホルム等の有機溶媒を使用しないため必要時間が60分以内

であり、従来の方法よりも短縮される。さらに、本発明の方法は、従来の抽出方法よりも安価で行うことができ、また、微量（約 $50 \mu\text{l}$ ）の試料で行うことが可能である。本発明の方法は、 0.5 ml チューブ内でチューブを交換する必要なしに全工程を行うことができる。これにより、単一工程で核酸抽出から増幅を行うことが可能となり、反応物の汚染の危険性が軽減される。

- いかなる理論にも縛られるわけではないが、本発明の方法の優れた抽出効率
は、その理由の一部として核酸の担体としてグリコーゲンを用いる点に起因する
と考えられる。本発明は、例えば、血液製剤もしくは子供の血液試料等の微量の
試料をスクリーニングする場合、さらにAIDS治療を行っている患者の検診に
特に有用であり、研究分野のみでなく臨床上の適用にも有用である。

請求の範囲

1. 還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を含み、タンパク質分解酵素を含まないことを特徴とする、核酸抽出用キット。

5 2. 塩を含まない、請求項1に記載の核酸抽出用キット。

3. 核酸がRNAである、請求項1または2に記載の核酸抽出用キット。

4. 還元剤が2-メルカプトエタノールまたはジチオスレイトールである、請求項1ないし3のいずれか1項に記載の核酸抽出用キット。

10 5. 共沈剤がグリコーゲンまたはデキストランである、請求項1ないし4のいずれか1項に記載の核酸抽出用キット。

6. タンパク質変性剤がグアニジンチオシアネートである、請求項1ないし5のいずれか1項に記載の核酸抽出用キット。

7. 生体試料から核酸を抽出する方法であって、

15 i) 生体試料に還元剤、共沈剤およびタンパク質変性剤を加えてインキュベートして、タンパク質分解酵素を用いることなく生体試料中のタンパク質およびその他の混在物を分解、変性し、そして

i i) そのまま低級アルコールを加えてアルコール沈殿を行うことを含む、前記核酸の抽出方法。

20 8. 工程i)において、インキュベートを、55℃-65℃で、5分-15分を行う、請求項7に記載の方法。

9. 工程i)において、インキュベートを約60℃で約10分間行う、請求項8に記載の方法。

10.

25 アルコール沈殿の際にタンパク質変性剤を加えることを含む、請求項7ないし9のいずれか1項に記載の方法。

11. 生体成分が体液または血液製剤である、請求項7ないし10のいずれか1項に記載の方法。

12. 生体試料の容量が $30\mu\text{l}$ ないし $100\mu\text{l}$ である、請求項7ないし10のいずれか1項に記載の方法。
13. 塩を添加する工程を含まない、請求項7ないし11のいずれか1項に記載の方法。
- 5 14. 上記工程を1本の 0.5ml チューブ内で行う、請求項7ないし12のいずれか1項に記載の方法。



図 1

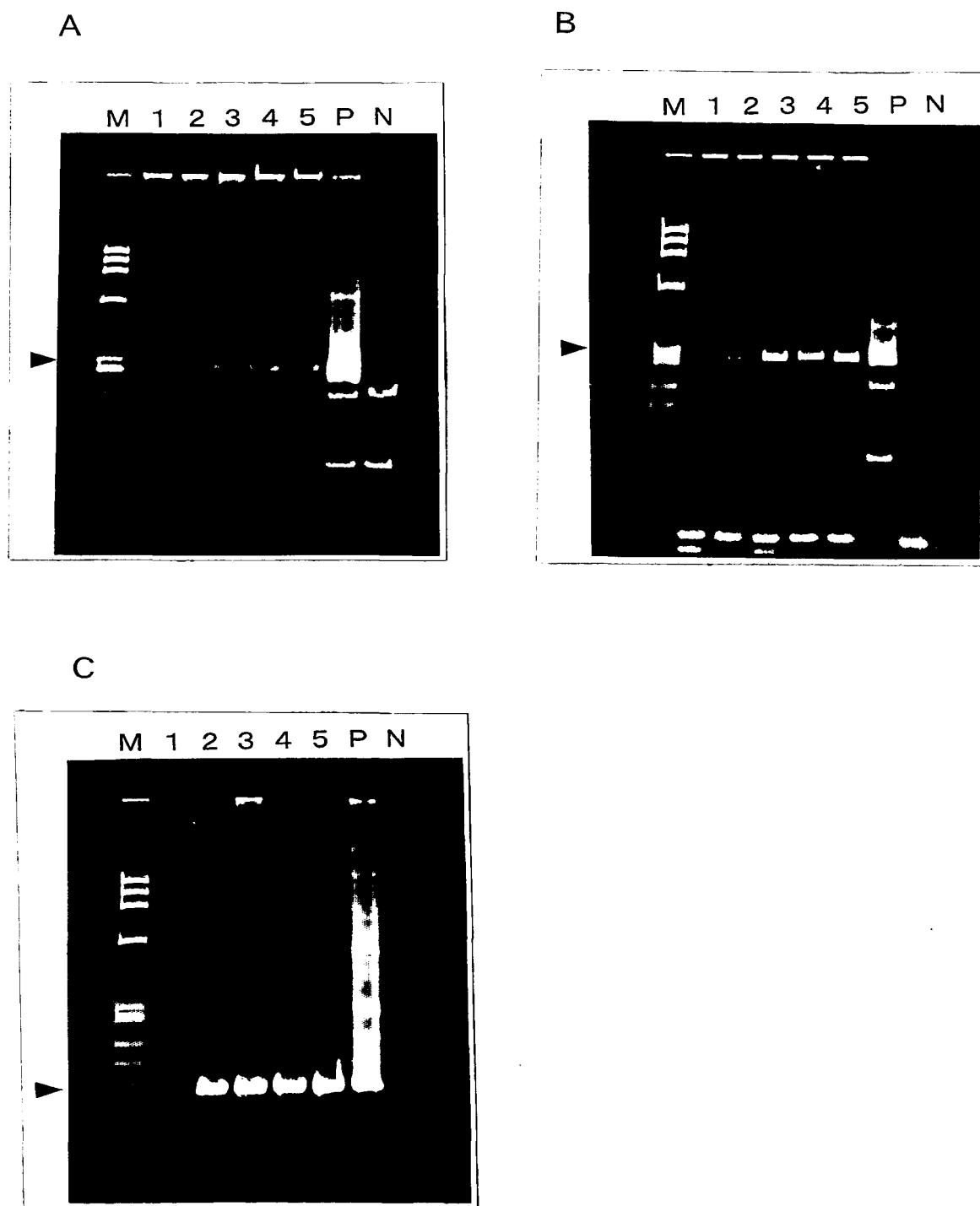
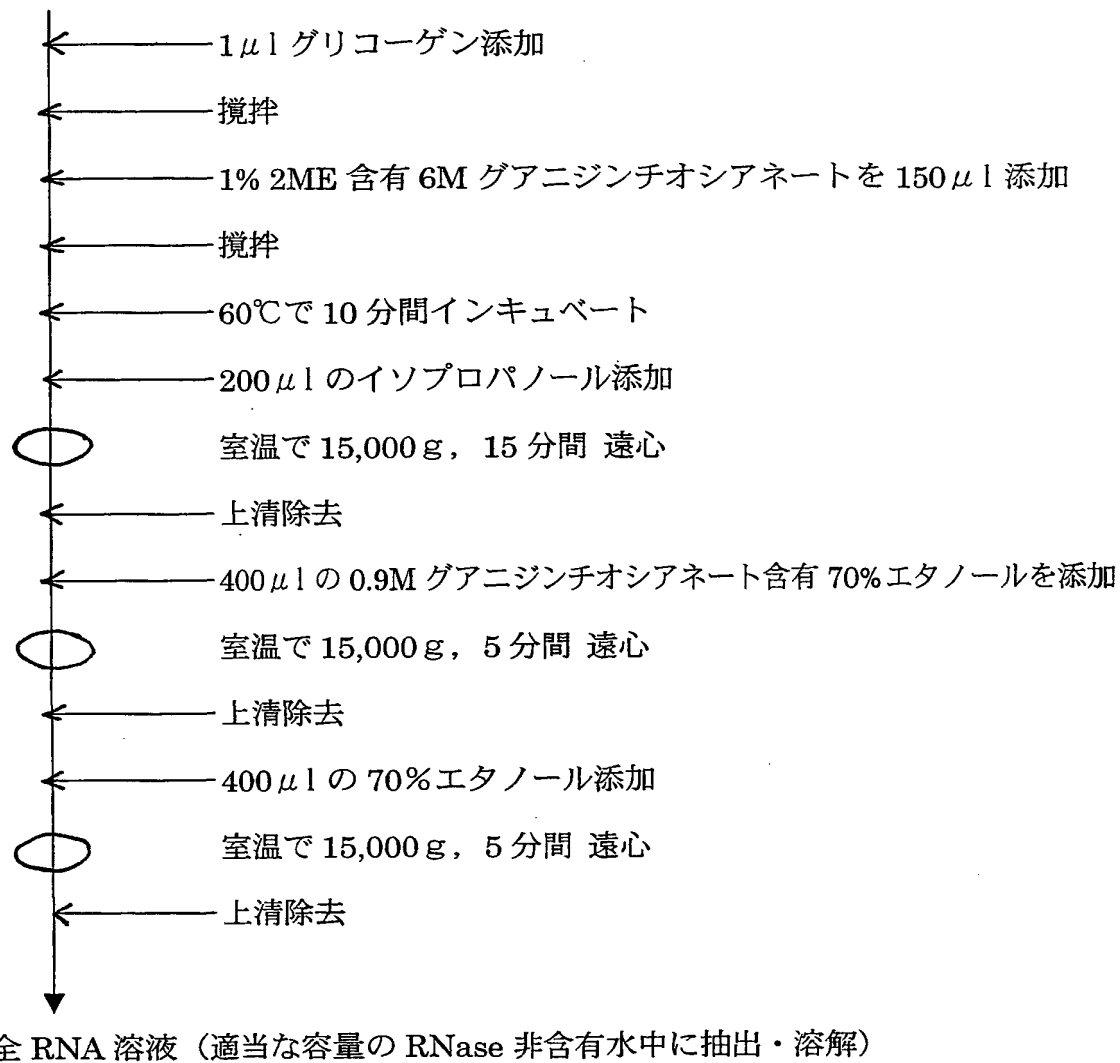




図 2

G G 法 の 手 法 の 流 れ 図

血清又は血漿試料 (各 0.5ml チューブ中 50 μ l)





☒ 3

	10	20	30	40	50	60	70
共通配列 E	CtATGCAaAT	gtTaaaAGat	aCcaTcaATG	agGAagCTGC	AGaaTgGGAc	aGggtACAtc	CAGTaCAtGC
試料 1	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 2	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 3	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 4	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 5	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 6	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-T-----C-	-A-----
試料 7	-C-----	-G-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 8	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 9	-C-----	-A-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
試料 10	-C-----	-C-----	-----	-----	-T-----	-----C-	-----
	80	90	100	110	120	130	140
共通配列 E	AgGGCCtatt	cCACCaaGGcc	AgatGAGaGA	ACCAAggGga	agTGAcATAG	CAGGaaacTAC	TAGtAcCctT
試料 1	-----	-A-----	-G-----	-----	-----	-----A-	-----
試料 2	-----	-----	-G-----	-----	-----	-G-----	-A-----
試料 3	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----
試料 4	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----
試料 5	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----C-	-----
試料 6	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----
試料 7	-----	-----	-G-----	-----	-T-----	-----	-----
試料 8	-----	-A-----	-G-----	-----	-----	-----	-----
試料 9	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----
試料 10	-----	-----	-G-----	-----	-----	-----	-----
	150	160	170	180	190	200	210
共通配列 E	caaGAACaaa	TaggaTgGAT	GACaaGCAAt	CCACcctatcc	CaGtggGgAGa	CaTcTATaAa	
試料 1	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
試料 2	-G-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
試料 3	-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
試料 4	-G-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
試料 5	-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
試料 6	-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
試料 7	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
試料 8	-----	-----	-----	-T-----	-----	-A-----	-----
試料 9	-G-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----
試料 10	-G-----	-----	-A-----	-----	-----	-----	-----



SEQUENCE LISTING

<110> Oriental Yeast Co., Ltd.

NAITOU Toshimuni

National Institute of Infectious Diseases

TAKEDA Yoshifumi

<120> Kit for extracting nucleic acids and the methods for
extracting nucleic acids by using the same

<130> YCT513

<160> 19

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 1

aaggatagag gtaaaagaca cca 23

<210> 2

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 2

tagctgctgg tccaatgctt tta 23

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence



<400> 3

atcaagcagc catgcaaat 19

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 4

cttttgggtcc ttgtcittatg tc 22

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 5

agtggatata tagaagcaga agt 23

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 6

cccccaatcc ccccttttct tttaaaa 27

<210> 7

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 7



attagcagga agatggcc 18

<210> 8

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<400> 8

tactcctiga ctttgggg 18

<210> 9

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 9

ctatgcaaat gttaaaagat accatcaatg aggaagctgc agaatgggac 50

agggtacatc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgagaga 100

accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caagaacaaa 150

taggatggat gacaagcaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200

agatggataa tcctgggatt 220

<210> 10

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 10

ccaatgcaaat gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc agaatgggat 50

agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc aaatgaggga 100

accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaacctt caagaacaaa 150

taggatggat gacaagcaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200



aggatggataa tcctgggatt

220

<210> 11

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 11

ccatgcaaat gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc agaatgggat 50

agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga 100

accaagggga agtgacatag cagggactac tagtaacctt caagaacaga 150

taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200

aggatggataa tcctgggatt 220

<210> 12

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 12

ccatgcaaat gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc agaatgggat 50

agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga 100

accaagggga agtgacatag cagggaactac tagtaccctt caagaacaaa 150

taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200

agatggataa tcctgggatt 220

<210> 13

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 13



ccatgcaa at gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc aga atgggat 50
agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga 100
accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caagagcaaa 150
taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200
aggtggataa tcctgggatt 220

<210> 14

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 14

ccatgcaa at gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc aga atgggat 50
agggtacacc caatacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga 100
accaagggga agtgacatag caggaaccac tagtaccctt caagaacaaa 150
taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200
aggtggataa tcctgggatt 220

<210> 15

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 15

ccatgcaa at gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc aga atgggat 50
agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga 100
accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caagaacaaa 150
taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200
aggtggataa tcctgggatt 220

<210> 16



<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 16

```
ccatgcaaat gttaaaagag accatcaatg aggaagctgc agaatgggat    50
agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga    100
accaagggga agtgatatag caggaactac tagtaccctt caagaacaaa    150
taggatggat gacaagcaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa    200
aggtggataa tcctgggatt                                     220
```

<210> 17

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 17

```
ccatgcaaat gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc agaatgggat    50
agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggac agatgaggga    100
accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caagaacaaa    150
taggatggat gacaagcaat ccactatcc cagtgggaga aatctataaa    200
aggtggataa tcctgggatt                                     220
```

<210> 18

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 18

```
ccatgcaaat gttaaaagaa accatcaatg aggaagctgc agaatgggat    50
agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga    100
accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caagaacaga    150
```



taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200
aggtggataa tcctgggatt 220

<210> 19

<211> 220

<212> DNA

<213> HIV-1

<400> 19

ccaatgcaa at gttaaaagac accatcaatg aggaagctgc agaatgggat 50
agggtacacc cagtacatgc agggcctatt ccaccaggcc agatgaggga 100
accaagggga agtgacatag caggaactac tagtaccctt caggaacaaa 150
taggatggat gacaaacaat ccacctatcc cagtgggaga catctataaa 200
aggtggataa tcctgggatt 220



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05170

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/10, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12Q1/68, C12N15/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
MEDLINE (STN) ,
WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 7-59572 A (TOSOH CORPORATION) ,	1-6
Y	07 March, 1995 (07.03.95) & DE 4333805 A1	1-14
X	JP 7-238101 A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.) ,	1-6
Y	12 September, 1995 (12.09.95) (Family: none)	1-14
Y	JP 6-289016 A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.) ,	1-14
	18 October, 1994 (18.10.94) (Family: none)	
A	JP 07-236499 A (Sumitomo Metal Industries, Ltd.) ,	1-14
	12 September, 1995 (12.09.95) (Family: none)	

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
30 October, 2000 (30.10.00)

Date of mailing of the international search report
07 November, 2000 (07.11.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12Q1/68、C12N15/10、G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁷ C12Q1/68、C12N15/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
MEDLINE (STN)、
WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	JP, 7-59572, A (東ソー株式会社) 7.3月.1995 (07.03.95) &DE, 4333805, A1	<u>1-6</u> 1-14
<u>X</u> Y	JP, 7-238101, A (住友金属工業株式会社) 12.9月.1995 (12.09.95) ファミリーなし	<u>1-6</u> 1-14
Y	JP, 6-289016, A (住友金属工業株式会社) 18.10月.1994 (18.10.94) ファミリーなし	1-14

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
30.10.00

国際調査報告の発送日 07.11.00

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)
甲斐 順子

4N 9641

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 07-236499, A (住友金属工業株式会社) 12. 9月. 1995 (12. 09. 95) ファミリーなし	1-14